

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU ⁽¹¹⁾ 2 612 300 ⁽¹³⁾ C1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C07D 487/04 \(2006.01\)](#)[A61K 31/53 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: может прекратить свое действие (последнее изменение статуса: 07.03.2019)
Пошлина: учтена за 3 год с 03.11.2017 по 02.11.2018

(21)(22) Заявка: [2015147151](#), 02.11.2015(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.11.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.11.2015

(45) Опубликовано: [06.03.2017](#) Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: В. Л.Русинов и др. "Азоло[5,1-с]-1,2,4-триазины - новый класс противовирусных соединений" Известия Академии наук Серия химическая, N5, 967-995, 2008, схема 2, соед. 15. Y. Yamada et al. "A simple synthesis of 1-substituted 5-aminopyrazoles and pyrazolo[1,5-a]-s-triazine derivative" Heterocycles, Vol.48, N10, 2095-2102, 1998. RU 2294936 C1, 10.03.2007.

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19,
УрФУ, ЦИС, Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Русинов Владимир Леонидович (RU),
Чупахин Олег Николаевич (RU),
Чарушин Валерий Николаевич (RU),
Сапожникова Ирина Михайловна (RU),
Близник Анастасия Михайловна (RU),
Спасов Александр Алексеевич (RU),
Петров Владимир Иванович (RU),
Кузнецова Валентина Андреевна (RU),
Соловьева Ольга Александровна (RU),
Мацевич Анастасия Игоревна (RU)

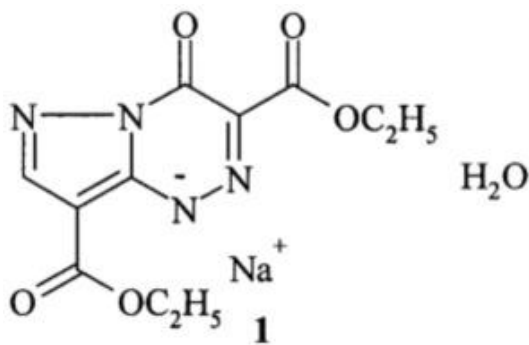
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина" (RU),
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) НАТРИЕВАЯ СОЛЬ ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА 4-ОКСО-1,4-ДИГИДРОПИРАЗОЛО[5,1-С]-1,2,4-ТРИАЗИН-3,8-ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ, МОНОГИДРАТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло-[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты моногидрату, обладающему антигликирующей активностью



Технический результат: получено новое соединение, обладающее антигликирующей активностью, которое может быть полезно для лечения и профилактики последствий сахарного диабета. 3 табл., 3 пр.

1. Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к области биологически активных соединений - натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрату, обладающей антигликирующей активностью, предназначенной для лечения и профилактики последствий сахарного диабета.

Изобретение может быть использовано в лечебных учреждениях и научно-исследовательских лабораториях.

2. Уровень техники

Неферментативное взаимодействие белков с глюкозой (реакция Майяра) приводит к образованию химических соединений - конечных продуктов гликирования (КПГ) (NA Ansari, Z Rasheed, 2010). Именно внутри- и внеклеточное накопление КПГ считают важным фактором патогенеза таких заболеваний, как атеросклероз, сердечная недостаточность, воспаление, ревматоидный артрит [1] и остеоартрит, нейродегенеративные заболевания [2], включая болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Особенно интенсивно данный процесс протекает при сахарном диабете и имеет немаловажное значение в развитии его осложнений [3-5] и скорость образования КПГ зависит от уровня и длительности экспозиции глюкозы [6]. Эффекты КПГ могут быть классифицированы как рецептор-независимые и -зависимые, могут действовать внутриклеточно или циркулировать и действуют на рецепторы клеточной поверхности, таких как рецепторы для КПГ (РКПГ). Поскольку гликирование происходит в течение длительного периода времени, КПГ влияют на долгоживущие белки, например, главными мишенями являются структурные компоненты соединительной ткани и, в частности, коллаген типа IV, но и другие долгоживущие белки могут также подвергаться гликированию, в том числе миелин, тубулин, активатор плазминогена 1, фибриноген. Накопление КПГ во внеклеточном матриксе приводит к образованию меж- и внутримолекулярных поперечных сшивок и повышению ригидности кровеносных сосудов. Кроме того, под действием КПГ изменяется состав внеклеточного матрикса, с повышенной экспрессией фибронектина, коллагена типа III, IV, VI и ламинина, возможно, опосредовано через активацию ключевых профибротических цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста β и фактор роста соединительной ткани. Рецептор-зависимые эффекты КПГ опосредованы их взаимодействием со специфическими рецепторами, что приводит к активации вторичных передатчиков, таких как протеинкиназа C. Ключевая мишень РКПГ - ядерный фактор NF- κ B, который перемещается в ядро и приводит к повышению транскрипции таких белков, как молекулы межклеточной адгезии-1, E-селектин, эндотелин-1, сосудистый эндотелиальный фактор роста, провоспалительные цитокины. Все вышеперечисленное лежит в основе патогенеза таких последствий сахарного диабета, как диабетические атеросклероз, нефро-, нейро-, ретино-, кардио-, ангиопатии, которые являются причиной высокого риска инвалидизации и смертности среди пациентов с сахарным диабетом.

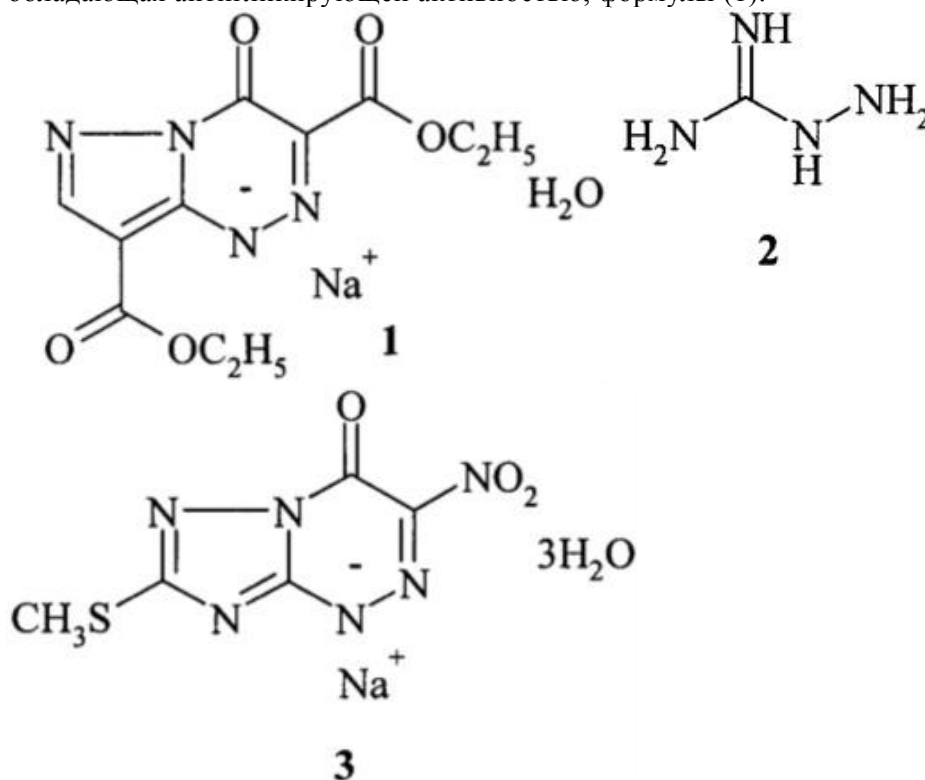
На сегодняшний день нет препаратов, специфически угнетающих образование КПГ, применяемых в клинической практике. Интерес к данной проблематике и поиску лекарственных средств, способных тормозить реакцию Майяра, снижать образование конечных продуктов гликирования и предотвращать развитие осложнений сахарного диабета, неуклонно растет. Первым и наиболее изученным веществом, ингибирующим гликирование белков, является аминоксидин 2 (АГ), выбранным в качестве прототипа. Он предотвращает формирование флюоресцирующих КПГ и глюкозопроизводных поперечносшитых молекул коллагена. Механизм антигликирующего действия аминоксидина связывают с его способностью захватывать реактивные дикарбонильные интермедиаты. Однако

клинические испытания данного препарата были остановлены в связи с его недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов [7, 8].

В ряду азоло-1,2,4-триазинов известны соединения, обладающие противовирусным действием. Противовирусный препарат Триазавирин - 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-он, тригидрат 3 [9] зарегистрирован в реестре лекарственных средств РФ как препарат для лечения гриппозной инфекции (№ гос. регистрации ЛП-002604).

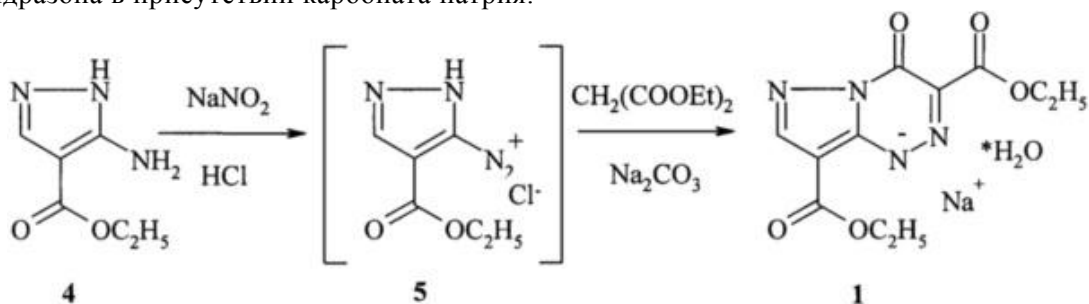
3. Сущность изобретения.

Сущность изобретения составляет натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат, обладающая антигликирующей активностью, формулы (1).



4. Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

4.1. Заявляемое соединение - натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат 1, получено по следующей схеме: диазотирование этилового эфира 5-аминопиразоло-4-карбоновой кислоты 4 с образованием диазопиразола 4, азосочетание с диэтилмалонатом с последующей циклизацией промежуточно образующегося гидразона в присутствии карбоната натрия.



Пример 1. Синтез натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрата 1:

1.08 (0.007 моль) г этилового эфира 5-аминопиразоло-4-карбоновой кислоты 3 растворяют в 1.4 мл соляной кислоты и 0.7 мл воды. Раствор охлаждают до -10°C и диазотируют раствором 0.5 г NaNO_2 в 0.7 мл воды. Полученный раствор соли диазония приливают к смеси 7 мл 2М раствора Na_2CO_3 и 0.78 мл (0.007 моль) диэтилмалоната, pH должен быть 8-10. Реакционную массу выдерживают 1 час при температуре от -10 до 0°C и 1 час при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают, сушат и перекристаллизовывают сначала из 50% уксусной кислоты, затем из 50% этанола. Выход 1.0 г (45%).

Заявляемое соединение - натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат 1,

имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл} > 250^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР спектр (DMSO- d_6 , м.д., КССВ, Гц): 1.31-1.36 (6H, м, 2CH_3) 4.23-4.31 (4H, м, 2CH_2), 8.09 (1H, с, CH). ^{13}C ЯМР спектр (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 14.28 (CH_3), 14.38 (CH_3), 59.35 (CH_2), 59.80 (CH_2), 99.99 ($\text{C}=\text{C}$), 128.86 ($\text{C}=\text{C}=\text{O}$), 146.13 ($\text{C}-\text{H}$), 148.31 ($\text{C}=\text{O}$), 150.93 ($\text{C}-\text{N}$), 162.19 ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$), 164.93 ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$). Найдено, %: С - 40.97; Н - 4.05; N - 17.24; $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{NaO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$; вычислено, %: С - 41.26; Н - 4.09; N - 17.50.

Физико-химические характеристики соединения 1 полностью соответствуют приписываемой структуре.

4.2. Пример 2. Определение антигликирующей активности соединения 1 в системе *in vitro*.

Реакцию гликирования воспроизводили по методу [10]. Конечный объем реакционной смеси составлял 1.5 мл. Реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) и глюкозы (500 mM) в фосфатном буфере (pH 7.4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия в конечной концентрации 0.02%. Все вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). В экспериментальные образцы добавляли 50 мкл раствора изучаемого соединения 1 в различных концентрациях, в контрольные образцы добавляли растворитель в аналогичном объеме. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 часов при 60°C . По истечении срока инкубации, проводили определение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм. В качестве вещества сравнения использовали аминогуанидин. Были изучены концентрационные зависимости антигликирующей активности и рассчитаны показатели концентраций IC_{50} , вызывающих снижение флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина на 50%.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, табличного редактора Microsoft Excel 2007 и программы GraphPad Prism 5.0.

В результате было установлено, что соединение 1 проявило высокую антигликирующую активность, превышающую активность вещества сравнения (Таблица 1). В связи с этим на следующем этапе была изучена зависимость антигликирующего эффекта соединения 1 от концентрации (Таблица 2). Полученные результаты позволили рассчитать показатели концентрации веществ, вызывающие снижение флуоресценции гликированного БСА на 50% (IC_{50}). Показатель IC_{50} для соединения 1 составил 53.96 μM , а для аминогуанидина - 765.00 μM .

Таблица 1

Антигликирующая активность соединения 1

Препарат	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), $\Delta\%$ ($M \pm m$)	
	Концентрация, 10^{-3} М	Концентрация, 10^{-4} М
Соединение 1	88.76 \pm 0.92*	65.33 \pm 2.00*
Аминогуанидин	57.83 \pm 0.58*	6.01 \pm 2.12*

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$).

Таблица 2

Зависимость антигликирующего эффекта соединения 1 от концентрации.

Препарат	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), Δ% (M±m)									IC ₅₀ , μM
	Концентрация, μM									
	1000	750	500	250	100	75	50	25	10	
Соединение I	91.75±0.42*	91.04±0.39*	87.56±0.34*	78.53±0.76*	62.06±1.36*	51.50±2.43*	40.29±1.71*	38.98±6.64	27.60±5.37	53.96
Аминогуанидин	58.08±0.72*	50.25±1.08*	38.75±1.52*	19.14±2.24*	3.53±2.31*	—	—	—	—	765.00

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$).

Пример 3. Определение LD_{50} при изучении острой токсичности на лабораторных животных.

Изучение острой токсичности заявляемого соединения 1 и вещества сравнения аминогуанидина проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11]. Острую суточную токсичность определяли на белых нелинейных мышах-самках массой 21-24 г при внутрибрюшинном введении. Величину токсикологического показателя - LD₅₀ рассчитывали по методу Миллера и Тейтнера [12]. Расчет показателей эффективной концентрации IC₅₀ и LD₅₀ проводили методом регрессионного анализа. В качестве показателя широты терапевтического действия использовали условный терапевтический индекс (УТИ), который рассчитывали как отношение величины LD₅₀ к IC₅₀.

При изучении острой токсичности заявляемого соединения 1 было установлено, что показатель LD₅₀ для данного вещества составил 518.4 мг/кг (Таблица 3). На основании полученных результатов был рассчитан показатель УТИ, по величине которого соединение 1 превосходит аминогуанидин в 4.27 раза.

Таблица 3

Показатели острой токсичности (LD₅₀), ингибирующей концентрации (IC₅₀) и условного терапевтического индекса (УТИ) соединения 1 и аминогуанидина.

Шифр вещества	IC ₅₀ , μM	IC ₅₀ , mM	LD ₅₀ , мг/кг	Mr	LD ₅₀ , mM	УТИ
Соединение 1	53.96	0.05396	518.4122	320.24	1.534	28.42
Аминогуанидин	765.00	0.765	562.5661	110.55	5.089	6.65

Примечание: УТИ – LD₅₀/IC₅₀.

Таким образом, заявляемое соединение - натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат - превосходит по антигликирующей активности и условному терапевтическому индексу вещество сравнения (прототип).

Список литературы

- [1] Syngle, A. et al. Advanced glycation end-products inhibition improves endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis / A. Syngle, K. Vohhra, N. Garg, L. Kaur, P. Chand // International Journal of Rheumatic Diseases. - 2012. - Vol. 15. - P. 45-55.
- [2] Li, J., et al. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective / J. Li, D. Liu, L. Sun, Y. Lu, Z. Zhang // Journal of the Neurological Sciences. - 2012. - Vol. 317. - P. 1-5.
- [3] Ansari, NA. Non-enzymatic glycation of proteins: from diabetes to cancer. / Ansari NA, Rasheed Z. // Biomed Khim. - 2010. - Vol. 56 (2). - P. 168-178.
- [4] Goh, S. - Y., Cooper, M.E. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes / S. - Y. Goh, M.E. Cooper // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2008. - Vol. 93(4). - P. 1143-1152.
- [5] Ramasamy, R. et al. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. R. Ramasamy, S.F. Yan, A.M. Schmidt. Ann N Y Acad Sci. - 2011.- Vol. 1243. - P. 88-102.
- [6] Балаболкин, М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. - 2002. - №4. - С. 8-16.
- [7] Freedman, B.I. et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (ACTION II) / B.I. Freedman, J. - P. Wuerth, K. Cartwright, R.P. Bain, S. Dippe, K. Hershon, A.D. Mooradian, B.S. Spinowitz // Control. Clin. Trials - 1999. - Vol. 20(5). - P. 493-510.
- [8] Bolton, W.K. et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy / W.K. Bolton, D.C. Cattran, M.E. Williams, S.G. Adler, G.B. Appel, K. Cartwright, P.G. Foiles, B.I. Freedman, P. Raskin, R.E. Ratner, B.S. Spinowitz, F.C. Whittier, J. - P. Wuerth // Am J Nephrol - 2004. - Vol. 24. - P. 32-40.
- [9] О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, Е.Н. Уломский, А.Ю. Петров, О.И. Киселев, Патент РФ 2294936 от 10.03.2007.
- [10] Jedsadayanmata, A. In Vitro Antiglycation Activity of Arbutin / A. Jedsadayanmata // Naresuan University Journal - 2005. - Vol. 13 (2). - P. 35-41.
- [11] Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, Гриф и К, Москва, 2012, 944 с.
- [12] Бельский, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, Медгиз, Ленинград, 1963, 146 с.

Натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропирозоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат, проявляющая антигликирующие свойства

